

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22409

研究課題名(和文) アダムからイブを作るー雄ゲノムのみによる個体作出の挑戦ー

研究課題名(英文) Make Eve from Adam - challenge of animal creation by using only male genome -

研究代表者

昆 泰寛 (Kon, Yasuhiro)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：10178402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：精巣に出現する卵細胞の意義を解明する、すなわち精子形成細胞が卵細胞に形質転換する機構を検証し、ついには雄ゲノムのみによる個体の作出に挑戦する。本研究では、MRL/MpJマウスの精巣に出現する卵母細胞の分離法を検討し、効率良くかつ形態も保持されたより多くの精巣内卵母細胞を回収する方法を模索した。精巣内卵細胞は用手法で最も効率よく分離され、その形態も維持された。一方、精巣内卵細胞と卵巣内卵細胞の機能的差異の考察や培養法の更なる検討が必要だと考えられた。本研究を発展させることで精巣内卵細胞の受精能や胚発生能が明らかとなり、動物の繁殖、特に家畜産生、生殖工学や希少動物個体保護等に应用されることを望む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRL/MpJマウスの生殖腺は特異な表現型を示し、精母細胞の減数分裂中期特異的アポトーシス、実験的停留精巣における精母細胞の熱ショック耐性、新生子卵巣における多数の肥満細胞の存在、さらに新生子精巣における精巣内卵母細胞の出現が報告されている。一方、MRL/MpJマウス精巣内卵母細胞は少数であり、精巣から卵母細胞を分離することは困難であるため、精巣内卵母細胞の受精および胚発生の機能は不明である。MRL/MpJマウス精巣内卵母細胞の解析を通じた雄個体由来雌性配偶子の機能解明は、哺乳類における単為生殖、さらにはその繁殖工学への応用など、獣医学の更なる発展に繋がる。

研究成果の概要(英文)：This study tries to elucidate the significance of oocytes in the testis, verify the mechanism of transformation of spermatogenic cells into oocytes, and finally generate individuals using only the male genome. Firstly, we examined methods to isolate oocytes appearing in the testes of MRL/MpJ mice and explore a method to collect the testicular oocytes efficiently and with preserved morphology. Testicular oocytes were most efficiently isolated by the manual, and their morphology was preserved. On the other hand, it was necessary to consider the functional differences between testicular oocytes and ovarian oocytes and further study of culture methods. We hope that the fertilization and embryogenesis potential of testicular oocytes will be clarified and applied their knowledge to animal reproduction, especially in livestock breeding, reproductive engineering, and the protection of rare animal populations.

研究分野：獣医学、動物生命科学、繁殖工学

キーワード：MRL/MpJ 精巣内卵細胞 分離法 精巣 曲精細管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MRL/MpJ-Faslpr/lpr (lpr)は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、自己免疫性外分泌腺炎や関節リウマチなどの自己免疫疾患を発症し、その野生型マウスである MRL/MpJ (MRL)も軽度の自己免疫異常を示す。また、MRL は耳パンチの閉鎖、腱、軟骨や心筋の再生など特異な創傷治癒形質を示す。興味深いことに、MRL の生殖腺は特異な表現型を示し、精母細胞の減数分裂中期特異的アポトーシス、実験的停留精巣における精母細胞の熱ショック耐性、新生子卵巣における多数の肥満細胞の存在、さらに新生子精巣における精巣内卵母細胞の出現が報告されている。この MRL 精巣内卵母細胞は胎生期から出現するが、出生後に減少し、生後 16 日 (D16)以降では二核などの形態異常がみられ、D30 までに消失する。この MRL 精巣内卵母細胞は精細管内で精子形成細胞とともに存在し、卵巣内の初期二次卵胞内卵母細胞と同程度の大きさを示し、zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3)陽性の透明帯と卵胞上皮細胞に囲まれている。また、MRL 精巣内卵母細胞は卵巣内卵母細胞特異的遺伝子の発現や H3K9me2 の脱メチル化や母性型の DNA メチル化パターンを示し、精子との融合能を有するなど、多くの卵巣内卵母細胞にみられる特徴を持つ。一方、MRL 精巣内卵母細胞は少数であり、精巣から卵母細胞を分離することは困難であるため、精巣内卵母細胞の受精および胚発生の機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、精巣に出現する卵細胞の意義を解明すること、すなわち精子形成細胞が卵細胞に形質転換する (アダムからイブを作り出す)機構を発見・発展させ、ついにはオスのゲノムのみによる個体の作出に挑戦する。本研究では、MRL 精巣内卵母細胞の分離法を検討し、効率良くかつ形態も保持されたより多くの精巣内卵母細胞を回収する方法を検討した。また、同法を用いて精巣内卵母細胞を回収後、マウス卵巣由来初期二次卵胞で確立されている三次元培養を応用して、MRL 精巣内卵母細胞を培養し、その成長を評価した。MRL 精巣内卵母細胞の解析を通じた雄個体由来雌性配偶子の機能解明は、哺乳類における単為生殖、さらにはその繁殖工学への応用など、獣医学の更なる発展に繋がる。

3. 研究の方法

1) 供試動物

本研究の動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従い、北海道大学大学院獣医学研究院動物実験委員会ならびに総長の承認を受けて実施した (承認番号: 16-0024、21-0008)。日本 SLC 社 (浜松、日本) から雌雄の MRL またはその妊娠個体を購入し、産子を得て、D8 - 20 (出生日を D0 とする) の個体を実験に供した。また雌雄の lpr を購入し、産子を得て、D4 の個体を実験に供した。

2) 精巣内卵母細胞の顕微鏡観察

雄個体に全身麻酔 [三種混合麻酔; メドミジン (0.75 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg)、10 mL/kg、腹腔内投与] を施して深麻酔下に置き、頸椎脱臼によって安楽死させ、精巣を採取した。定法に従って光学顕微鏡下で観察した。

3) 精巣と卵巣の遺伝子発現解析

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) で解析した。Actb : Actin, beta. Gdf9 : Growth differentiation factor 9. Nobox : Nobox oogenesis homeobox. ZP1 : Zona Pellucida glycoprotein 1. ZP2 : Zona Pellucida glycoprotein 2. ZP3 : Zona Pellucida glycoprotein 3 のバンドを解析した。

4) 卵母細胞スコアの推定

D8、D10、D12、D14、D16、D18、D20 の MRL 精巣を使用し、各精巣を用いてホルマウント標本を作製後、実体顕微鏡下で精巣内卵母細胞を計数し、精巣当たりの平均卵母細胞数を求め、精巣内卵母細胞スコアとした。

5) 卵母細胞の分離

D12 - 18 で安楽死してから MRL 精巣または卵巣を採取し、過去の報告を参考にし、3つの方法 (用手法、酵素法、密度勾配遠心法) で卵母細胞を分離した。精巣および卵巣の卵母細胞を各方法で分離し、得られた卵母細胞数を使用した臓器数で割算した値を回収効率とした。

6) 精巣内卵母細胞の培養

既報の三次元培養を応用した。卵母細胞含有コラーゲンゲル培地を 100 μ L の成長培地で覆い、37、5% CO₂ 濃度で9日間培養した。培養中の卵母細胞を ZEISS Axio Zoom.V16 for Biology で観察し、その画像を撮影した。得られた画像を用いて、卵母細胞の中心で直角に交わるように直径を2方向から計測し (ImageJ、NIH ; ベセスダ、メリーランド州、米国)、その平均値を細胞直径として評価した。

7) 精巣内卵母細胞の電子顕微鏡解析

lpr の精巣 (D4) または用手法で単離した精細管内の精巣内卵母細胞 (D12) を用い、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

4. 研究成果

1) 精巣内卵母細胞の形態

組織標本において、MRL 精巣内卵母細胞は曲精細管内にみられ、基底部分から離れて存在した (図 1A - D)。精巣内卵母細胞の大きさは直径約 50 μ m で、その形態は周囲の精子形成細胞や支持細胞とは明らかに異なり、ホルマウント標本でも精巣内卵母細胞を同定した (図 1A)。精巣内卵母細胞は PAS 陽性の透明帯で囲まれ (図 1B)、ヘマトキシリンで濃染された核小体をもつ大型の核を有した (図 1C)。また、精巣内卵母細胞周囲には単層の扁平または立方状の卵胞上皮細胞様細胞が付着していた (図 1D)。これまで精巣内卵

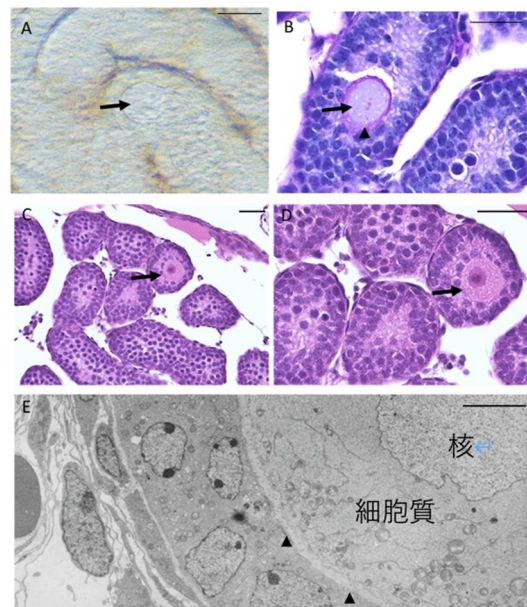


図 1. 精細管内の精巣内卵母細胞

母細胞の形態における lpr と MRL の系統差は報告されておらず、本研究では lpr の精巣内卵母細胞を TEM で観察した。その結果、透明帯を半分程度の厚さまで貫通する微絨毛が精巣内卵母細胞から伸長し (図 1E)、卵胞上皮様細胞と卵母細胞間の細胞質突起による結合も観られた。以上より、精巣内卵母細胞は、マウス卵巣の原始卵胞または一次卵胞に包含される卵母細胞の形態

に似ることがわかった。

2) 精巣における卵巢特異的遺伝子の発現

D12 の MRL 卵巢と精巣における卵巢特異的遺伝子の発現を PCR で解析した。用いた卵巢および精巣共に、Nobox、Gdf9 の発現がみられた。また、Zp1、Zp2 および Zp3 の発現が卵巢で見られた。一方、精巣では Zp3 の発現がみられた。

3) 精巣内卵母細胞スコアの推定

MRL の精巣内卵母細胞スコアは D8 - D14 において上昇し、D14 で最大 (1.50) となった。また、D14 以降に減少し、D20 で最少 (0.31) となった。

4) 精巣内卵母細胞の回収効率および形態

D12 - 17 から採取した MRL 卵巢において、卵母細胞の回収効率は用手法、酵素法および密度勾配遠心法で各々 19.6、57.7、15.1 個 / 卵巢となった。対して、D12 - 18 から採取した MRL 精巣内卵母細胞の回収効率は卵巢よりも顕著に低く、用手法および酵素法で各々 0.2、0.1 個 / 精巣となった。精巣内卵母細胞は密度勾配遠心法で分離されなかった。

図 2 に分離した MRL 卵母細胞の形態を示す。多くの卵巢内卵母細胞は顆粒層細胞に包まれており、核や透明帯は確認されなかった。用手法で分離した卵巢内卵母細胞は顆粒層細胞に包まれ、基底膜も残り、その多くは細胞の輪郭が明瞭であった (図 2 A)。酵素法では、用手法と同様に顆粒層細胞に包まれた卵母細胞が多くみられたが、基底膜は消失し、卵母細胞の輪郭は不明瞭だった (図 2 B)。密度勾配遠心法では、基底膜は消失し、顆粒層細胞は卵母細胞から剥離していた (図 2 C)。分離した精巣内卵母細胞において、卵胞上皮細胞

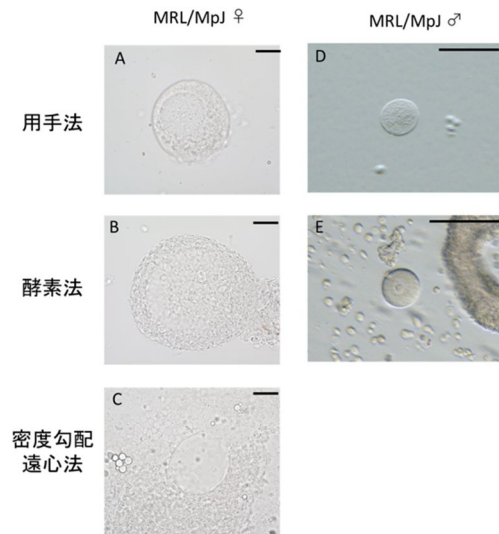


図 2. 各分離法で得た卵巢内卵母細胞および精巣内卵母細胞の形態

様細胞は用手法では一部残存し、酵素法ではみられなかった (図 2 D、E)。両分離法で得られた精巣内卵母細胞卵母細胞卵母細胞卵母細胞において、透明帯や大型の核は明瞭だったが、酵素法で分離した一部の精巣内卵母細胞では透明帯が消失していた (図 2 D、E)。

用手法で単離した D12 の lpr 精細管を用い、精巣内卵母細胞の超微形態を TEM で観察した (図 3)。卵母細胞周囲は透明帯に囲まれ、それに付着した卵胞上皮様細胞がみられ、卵胞上皮様細胞からは透明帯を貫通して細胞質突起様突起が伸長していた。卵母細胞の細胞質には大小の顆粒がみられた。以上より、精巣内卵母細胞の形態において、精細管用手法分離の前後で大きな変化はなかった。

5) 培養した精巣内卵母細胞の形態

D15 および 17 の MRL から用手法で分離した 2 つの

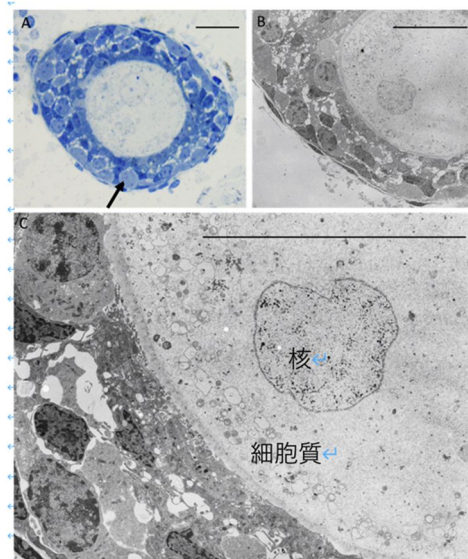


図 3. 用手法で単離した精巣内卵母細胞の超微形態

精巣内卵母細胞を培養し、経時的な形態変化を実体顕微鏡下で観察した。分離直後（培養 0 日目）において、1 個目の精巣内卵母細胞は卵胞上皮様細胞に包まれておらず、透明帯と考えられる構造や大型の核を有し、円形だった（図 4 A）。培養 1 日目以降、透明帯と卵母細胞に間隙がみられた（図 4 B）。培養 9 日目、透明帯と卵母細胞間の間隙は拡がり、卵母細胞は大きさを減じ、色は褐色を増した（図 5 C）。2 個目の精巣内卵母細胞は、培養 0 日目において卵胞上皮細胞様細胞に包まれていたが、透明帯は明瞭ではなかった（図 4 D）。培養 1 日目以降、卵母細胞周囲の卵胞上皮様細胞は一部剥離していた（図 4 E）。ほとんどの卵胞上皮細胞様細胞は培養 8 日目までに卵母細胞から剥離し、培養 9 日目に卵母細胞の形態は崩れていた（図 4 F）。培養した精巣内卵母細胞径の計測において、培養 0 日目では平均 $58.97 \mu\text{m}$ であり、培養期間で最も大きかった（図 4 G）。一方、卵母細胞の大きさは培養日数と共に徐々に減少し、9 日目では $32.89 \mu\text{m}$ だった。

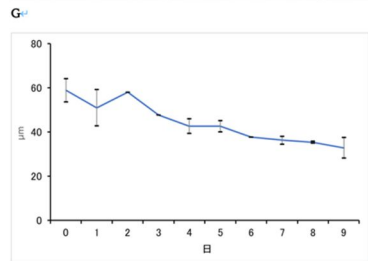
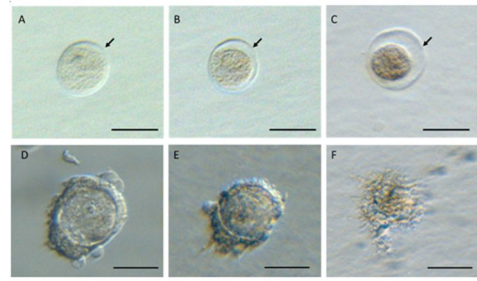


図 4. 培養した精巣内卵母細胞の形態観察

まとめ)

目的：精巣に出現する卵細胞の意義を解明すること、すなわち精子形成細胞が卵細胞に形質転換する（アダムからイブを作り出す）機構を発見・発展させ、ついにはオスのゲノムのみによる個体の作出に挑戦する。本研究では、MRL 精巣内卵母細胞の分離法を検討し、効率良くかつ形態も保持されたより多くの精巣内卵母細胞を回収する方法を検討した。

方法：10 - 18 日齢の雌雄 MRL から卵巣と精巣を採取し、光学顕微鏡、実体顕微鏡、透過型電子顕微鏡で形態を観察した。MRL の精巣内卵細胞を分離するため、用手法、酵素法および密度勾配遠心法を検討した。また、各分離法で得た細胞を用いマウス一次および初期二次卵胞の培養に有用なコラーゲンゲル三次元培養法で 9 日間培養し、その形態変化を評価した。

結果：MRL の精巣内卵細胞は精細管中央に位置し、明瞭な核小体を持つ大型の核や透明帯を有し、卵胞上皮様細胞に囲まれていた。MRL 精巣では卵巣機能関連遺伝子（Gdf9, Nobox）が発現していた。その回収効率は用手法で最も高く 0.23 個/1 精巣だった。用手法で精細管ごと分離した精巣内卵細胞の電子顕微鏡下形態解析において、透明帯や卵胞上皮様細胞の残存を確認した。培養後の最大径は培養 0 日目で $58.97 \mu\text{m}$ であり、9 日目には $32.89 \mu\text{m}$ と減少した。

考察：精巣内卵細胞は用手法で最も効率よく分離され、その形態も維持された。一方、今回の培養法で細胞は成長しなかったため、精巣内卵細胞と卵巣内卵細胞の機能的差異の考察や培養法の更なる検討が必要だと考えられた。本研究を発展させることで精巣内卵細胞の受精能や胚発生能が明らかとなり、動物の繁殖、特に家畜産生、生殖工学や希少動物個体保護等に应用されることを望む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Islam Md. Rashedul, Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Takao Irie, Masum Md. Abdul, Yuki Otani, Takashi Namba, Chuluunbaatar Tsolmon, Yaser Hosny Ali Elewa, Yasuhiro Kon	4. 巻 11
2. 論文標題 Developmental Changes of the Ovary in Neonatal Cotton Rat (<i>Sigmodon hispidus</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 601927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.601927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 落井真史（指導：昆泰寛）
2. 発表標題 MRL/MpJマウスの精巣に出現する卵母細胞の分離および培養法の検討
3. 学会等名 第38回北海道三大学獣医解剖学会合同セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Islam Md. Rashedul、市居修、中村鉄平、入江隆夫、Md. Abdul Masum、Yaser Hosny Ali Elewa、昆泰寛
2. 発表標題 Developmental changes of the ovary in the neonatal cotton rat
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Islam Md. Rashedul
2. 発表標題 DEVELOPMENTAL CHANGES OF THE OVARY IN THE NEONATAL COTTON RAT (<i>Sigmodon hispidus</i>)
3. 学会等名 The 9th Sapporo Summer Symposium for One Health
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md. Rashedul Islam, 市居 修, 中村鉄平, 入江隆夫, 篠原明男, Md. Abdul Masum, Yaser Hosny Ali Elewa, 昆 泰寛
2. 発表標題 Comparison of ovarian morphology and follicular disturbances between two inbred strains of cotton rats (<i>Sigmodon hispidus</i>)
3. 学会等名 第1回日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Kon
2. 発表標題 Analysis of gonad abnormalities in autoimmune disease model MRL/MpJ mice.
3. 学会等名 The 7th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 昆 泰寛
2. 発表標題 自己免疫疾患モデルMRL/MpJマウスの生殖腺異常に関する解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第65回東北・北海道連合支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本獣医解剖学会 編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学窓社	5. 総ページ数 416
3. 書名 獣医組織学 第八版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部解剖学教室ホームページ
<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/>
 北海道大学獣医学研究院解剖学教室
<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 鉄平 (Nakamura Teppei) (80786773)	北海道大学・獣医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	市居 修 (Ichii Osamu) (60547769)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	エレワ ヤセル (Elewa Yaser) (30782221)	北海道大学・獣医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
バングラデシュ	Sher-e-Bangla Agricultural University			
モンゴル	Mongolian University of Life Science			